

10/531114
JC12 Rec'd PCT/AT 11 APR 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: CLAUDIA HEMMERLING ET AL.)
)
For: METHOD AND MICROORGANISM FOR THE)
PRODUCTION OF D-MANNITOL)

CLAIM FOR PRIORITY

Mail Stop PCT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

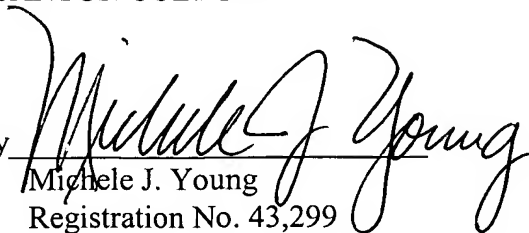
Dear Sir:

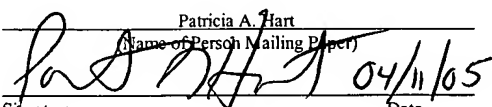
Applicant hereby claims the benefits of the filing date of October 9, 2002 to German Application No. 102 47 147.9 under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

If any fees are due with regard to this claim for priority, please charge them to Deposit Account No. 06-1130 maintained by Applicant's attorneys.

Respectfully submitted,

CANTOR COLBURN LLP

By 
Michele J. Young
Registration No. 43,299

I certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express mail in an envelope addressed to: Mail Stop PCT, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on	
April 11, 2005 (Date of Deposit)	
Patricia A. Hart (Name of Person Mailing Paper)	
 Signature	04/11/05 Date
EV607365982US Express Mail Label	

Date: April 11, 2005
Address: 55 Griffin Road South, Bloomfield, Connecticut 06002
Telephone: (860) 286-2929
Customer No. 023413

28. 10. 2003

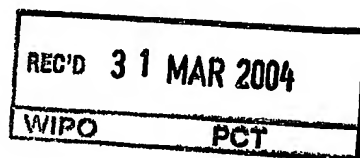


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 47 147.9



Anmeldetag:

09. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber:

Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich/DE

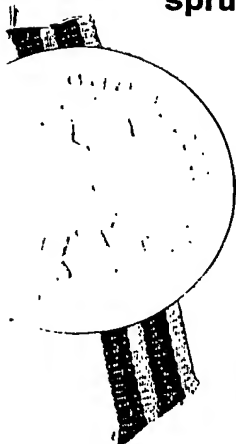
Bezeichnung:

Verfahren sowie Mikroorganismus zur Herstellung
von D-Mannitol

IPC:

C 12 P, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**



München, den 21. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Werner

B e s c h r e i b u n g

Verfahren sowie Mikroorganismus zur Herstellung von D-Mannitol

Die Erfindung betrifft ein Verfahren sowie einen Mikroorganismus zur Herstellung von D-Mannitol.

5 Der weltweite Jahresbedarf am Zuckeralkohol D-Mannitol (D-Mannit) beläuft sich auf 30.000 Tonnen im Jahr. D-Mannitol findet Verwendung im Lebensmittelbereich als zahnschonender Süßstoff, in der Medizin als Plasmaexpander und Vasodilator (Hexanitroderivat), sowie in der pharmazeutischen Industrie zur Produktion von Tabletten.

10

Die großtechnische Produktion von D-Mannitol erfolgt bisher über die katalytische Hydrierung an Metallkatalysatoren von Glucose/Fructose-Gemischen als Ausgangsmaterialien. Aufgrund der fehlenden Stereospezifität der katalytischen Hydrierung beträgt die Ausbeute an D-Mannitol nur
15 25-30% mit einem dreifachen Überschuß an D-Sorbitol (Makkee M, Kieboom APG, Van Bekkum H (1985), Production methods of D-mannitol. *Starch/Stärke* 37: 136-140).

20

D-Mannitol und D-Sorbitol unterscheiden sich nur durch ihre Konfiguration am Kohlenstoffatom C-2 (Stereoisomere), so dass eine Abtrennung des unerwünschten Sorbitols mit Schwierigkeiten verbunden und aufwändig ist.

25

Eine Alternative bietet die Herstellung von D-Mannitol durch enzymatische Hydrierung von D-Fructose in einem mikrobiellen Biotransformationsverfahren, bei dem eine rekombinante Mannitol-Dehydrogenase (MDH) aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert wird und zusammen mit einer Formiat-Dehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* und NADH in einem Membranreaktor inkubiert wird (Slatner, M. et al. (1998) Biotransf. 16: 351-363).

Durch den Einsatz der Formiat-Dehydrogenase wird ein Reduktions-Oxidationszyklus für NADH geschaffen, welches durch die Membran im Reaktionsgefäß zurückgehalten wird. Dadurch konnten lediglich 70-90% der Fructose in D-Mannitol umgewandelt werden. Ferner besitzt die eingesetzte Mannitol-Dehydrogenase eine mangelnde Stabilität (50 h Halbwertszeit; nach Stabilisierung mit Dithiothreitol: 100h), Empfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen $>30^{\circ}\text{C}$ sowie gegenüber Scherkräften. Ein weiterer großer Nachteil liegt darin, dass Membranreaktoren auf Grund der hohen Kosten für isolierte Enzyme, benötigte Cofaktoren und Membranen für eine großtechnische Produktion ungeeignet sind.

Eine weitere Möglichkeit der D-Mannitol Produktion bietet ein fermentatives Verfahren, wobei Ausbeuten von ca. 85% unter Einsatz von D-Fructose/D-Glucose-Gemischen als Substrate und dem heterofermentativen Milchsäurebakterium *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291 als katalysierenden Organismus in einer Fermentation mit wachsenden Zellen erhalten wurden (Soetaert (1991) Synthesis of D-mannitol and L-sorbose by microbial hydrogenation and dehydrogenation of monosaccharides. PhD Thesis, University of Gent)). Das Gen der MDH aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* und dessen Charakterisierung ist ebenfalls bekannt (J. Aarnikunnas et. al., Applied Microbiology and Biotechnology, 13. Juli 2002). Die hierbei für die Reduktion von Fructose zu D-Mannitol notwendigen Reduktionsäquivalente stammen aus der Oxidation von Glucose zu organischen Säuren. Neben dem Problem der nur 85%igen Umsetzung des Substrates Fructose zu D-Mannitol ist der Einsatz von D-Glucose nachteilig, da eine Kontamination des Zielproduktes mit organischen Säuren während der Fermentation auftritt und diese organischen Säuren durch aufwendige Prozeßschritte entfernt werden müssen. Bei Fermentationen mit wachsenden Zellen kann keine 100%ige Umsetzung des Substrates zum Produkt erzielt werden, da ein Teil des Substrates zum Zellaufbau bzw. zur Neubildung von Biomasse verbraucht wird. Zudem ist die Fermentation von *Leuconostoc mesenteroides* schwierig (Schleimbildung)

und teuer aufgrund der komplexen Medien und die Aufarbeitung des Überstandes daher ebenfalls aufwändig.

Aus der Literatur sind drei weitere Mannitol-2-Dehydrogenasen bekannt und auch hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und Nukleotid-/Aminosäuresequenzen beschrieben. Hierzu gehört die Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 (Brünker P, Altenbuchner J, Mattes R (1998) Structure and function of the genes involved in mannitol, arabitol and glucitol utilization from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106. *Gene* **206**: 117-126.), aus *Rhodobacter sphaeroides* Si4 (Schneider KH, Giffhorn F, Kaplan S (1993) Cloning, nucleotide sequence and characterization of the mannitol dehydrogenase gene from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Gen. Microbiology* **139**: 2475-2484) sowie aus *Agaricus bisporus* (Stoop JM, Mooibroeck H (1998) Cloning and characterization of NADP-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom *Agaricus bisporus*, and its expression in response to NaCl stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4689 – 4696.). Die beiden Erstgenannten gehören zur Gruppe der langkettigen Dehydrogenase/Reduktase Protein Familie (LDR), die letztgenannte zur Gruppe der kurzkettigen Dehydrogenase/Reduktase Protein Familie (SDR).

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von D-Mannitol bereitzustellen, das die beschriebenen Nachteile des Standes der Technik vermeidet.

25

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Produktion von D-Mannitol mittels eines Mannitol-2-Dehydrogenase (MDH) exprimierenden Organismus, wobei die Zucker-Substrate und/oder Zucker-Substratvorläufer der MDH über ein nicht-phosphorylierendes Zucker-Transportsystem in den Organismus transportiert werden, gelöst.

30

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird erreicht, dass der mit der MDH umzusetzende Zucker ohne eine vorherige Phosphorylierung direkt durch die MDH zu D-Mannitol umgesetzt werden kann. Durch diese direkte Umsetzung werden überraschenderweise gegenüber dem bisherigen Stand der Technik verbesserte Ausbeuten und Konzentrationen des D-Mannitol im Reaktionsüberstand ermöglicht. Teilweise werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren schon Ausbeuten von bis 100 % bezogen auf das Substrat (Glukose) erhalten. Ferner werden Konzentrationen bis zu 40 g/L mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzielt.

Unter Organismus werden sowohl ein – als auch mehrzellige Organismen, insbesondere Mikroorganismen verstanden.

Ferner wird die Aufgabe durch einen Mikroorganismus gelöst, der die Enzyme MDH gemäß Sequenz Nr. 2 und FDH gemäß Sequenz Nr. 3 zur mikrobiellen Herstellung von D-Mannitol exprimiert und ein nicht-phosphorylierendes Zucker-Transportsystem aufweist, das die Zucker-Substrate und/oder Zucker-Substratvorläufer der MDH in den Mikroorganismus transportiert.

Unter der Bezeichnung D-Mannitol soll nachfolgend auch D-Mannit verstanden werden.

Im Rahmen dieser Erfindung werden alle Nukleotidsequenzen, die für eine Mannitol-2-Dehydrogenase codieren unter der Bezeichnung "*mdh*-Gensequenz" zusammengefasst. Das Enzym Mannitol-2-Dehydrogenase wird im Folgenden unter der Bezeichnung „MDH“ zusammengefasst.

Entsprechend werden alle Nukleotidsequenzen, die für eine Formiat-Dehydrogenase codieren unter der Bezeichnung "*fdh*-Gensequenz" zusammengefasst. Das Enzym Formiat-Dehydrogenase wird im Folgenden unter der Bezeichnung „FDH“ zusammengefasst.

Auch werden alle Nukleotidsequenzen, die für einen Glukosefacilitator codieren unter der Bezeichnung „*glf*-Gensequenz“ zusammengefasst. Das Protein Glukosefacilitator wird im Folgenden unter der Bezeichnung „GLF“ zusammengefasst.

- 5 Ferner werden unter Nukleotidsequenz alle Nukleotidsequenzen verstanden, die (i) exakt den dargestellten Sequenzen entsprechen; oder (ii) mindestens eine Nukleotidsequenz umfassen, die innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes den dargestellten Sequenzen entspricht; oder (iii) mindestens eine Nukleotidsequenz umfasst, die mit einer
- 10 zur Nukleotidsequenz (i) oder (ii) komplementären Nukleotidsequenz hybridisiert, und gegebenenfalls (iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i) umfasst. Dabei bedeutet der Begriff funktionsneutrale Sinnmutationen den Austausch chemisch ähnlicher Aminosäuren, wie z. B. Glycin durch Alanin oder Serin durch Threonin.

- 15 Erfindungsgemäß sind auch die den kodierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder das RNA Processing sowie
- 20 die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u. a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder Translationsverstärker.

- 25 Unter die jeweiligen Enzyme fallen auch Isoformen, die als Enzyme mit gleicher oder vergleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität verstanden werden, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

- Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Enzyme zu verstehen,
- 30 bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N- und/oder C-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Enzyms zu beeinträchtigen. Diese

Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach bekannten Methoden vorgenommen werden.

Vorteilhafterweise handelt es sich bei dem Zucker-Transportsystem um den Glukosefacilitator (GLF) gemäß Nukleotidsequenz Nr. 1, der bevorzugterweise aus einem Eukaryonten z. B. einer Hefe stammt. Bevorzugterweise kann auch der GLF aus *Zymomonas mobilis* eingesetzt werden, der von T. Conway et al (Journal of Bacteriology, Dec. 1990, p. 7227 - 7240) kloniert wurde.

Aus der Deutschen Patentanmeldung 198 18 541.3 ist zwar ein Verfahren zur Herstellung von Substanzen aus dem aromatischen Stoffwechsel bekannt, bei dem ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der eine erhöhte Aktivität eines Glukose-oxidierenden Enzyms aufweist und Glukose oder Glukose-haltige Substrate durch Oxidation zu Glukonolakton oder Glukonat sowie durch Phosphorylierung des Glukonats zu 6-Phosphoglukonat umgesetzt, wobei neben der Erhöhung der Enzymaktivität der Oxidase und / oder der Phosphatase zur Erhöhung der vorhandenen Menge PEP die Aktivität eines PEP-unabhängigen Glukose-Transportproteins erhöht werden, bei dem es sich um den Glukosefacilitator (GLF) aus *Zymomonas mobilis* handeln kann. Ein Verfahren zur Herstellung von Mannitol ist allerdings daraus nicht zu entnehmen.

Der GLF kann neben Fructose auch Glukose oder Xylose transportieren, wovon insbesondere Glukose als preiswerter Fructose-Vorläufer interessant ist. Die Glukose kann, wie noch beschrieben werden wird, in Fructose umgewandelt werden.

Die für MDH codierende Sequenz aus Mikroorganismen der Familie der Lactobacteriaceae, insbesondere *Leuconostoc pseudomesenteroides* eignet sich besonders für die Umsetzung zu D-Mannitol aufgrund der hohen Aktivität und Stabilität der daraus synthetisierten MDH.

Bevorzugt exprimiert der Organismus die Sequenz Nr. 2 codierend für MDH.

Als Organismus eignen sich besonders Mikroorganismen aus der Gattung *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, den Enterobacteriaceae oder methylotrophen Hefen und Pilzen. Weiterhin können auch alle in der Lebensmittelindustrie verwendeten Mikroorganismen eingesetzt werden.

Besonders bevorzugt stammt der eingesetzte Organismus aus der Gruppe *Achromobacter parvulus*, *Methylobacterium organophilum*, *Mycobacterium formicum*, *Pseudomonas spec. 101*, *Pseudomonas oxalaticus*, *Moraxella sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Paracoccus sp.*, *Ancylobacter aquaticus*, *Maxcobacterium vaccae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Gluconobacter oxydans*, *Candida boidinii*, *Candida methylica* oder auch *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus nidulans* oder *Neurospora crassa* oder insbesondere *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis*.

Die Analyse der D-Mannitol-Konzentration kann enzymatisch / photometrisch nach der Methode von K. Horikoshi (Horikoshi K. (1963) Meth. Enzym. Analysis, 3rd ed. Vol.6. H. U. Bergmeyer, Hrsg., Verlag Chemie, Weinheim), oder durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Lindroth et al. (1979) Analytical Chemistry 51: 1167-1174) beschrieben.

25

Zur Etablierung eines Oxidations-Reduktionszyklus kann eine Formiat-Dehydrogenase (FDH) codierende Sequenz eingesetzt werden. Vorzugsweise stammt diese aus *Mycobacterium vaccae* und besitzt eine Nukleotidsequenz gemäß Sequenz Nr. 3. Diese ist für sich gesehen aus K. Soda et al, Appl. Microbiol. Biotechnol (1995) 44, 479-483 bekannt.

30

Hierdurch wird eine erhebliche Steigerung der Ausbeute bzw. der Umsatzrate des Substrates Fructose zu Mannitol durch Schaffung eines Cofaktor-Regenerationssystems ermöglicht. Dabei wird nicht mehr das Substrat für die Bereitstellung der für die Reduktion von Fructose zu Mannitol notwendigen Reduktionsäquivalente verbraucht, sondern durch ein zweites Enzymsystem bereitgestellt. Folglich steht das Coenzym NADH in erhöhtem Maße für die Umsetzung zu Mannitol zur Verfügung. Eines der am häufigsten eingesetzten Systeme ist die Regenerierung mit einer Formiat-Dehydrogenase, z. B. aus *Mycobacterium vaccae*. Durch den Einsatz dieses Enzyms zusammen mit einer beliebigen MDH, bevorzugt aus *Leuconostoc pseudomesenteroides*, wird ein Oxidations-Reduktionszyklus geschaffen, in dem Formiat als Elektronendonator und D-Fructose als Elektronenakzeptor fungiert. Dabei katalysiert das Enzym Formiat-Dehydrogenase die Oxidation von Formiat zu CO_2 und das Enzym MDH die Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol (s. Fig. 1). Der intrazelluläre Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)-Pool dient als Elektronen-Shuttle zwischen beiden Enzymen. Die Oxidation von Formiat zu CO_2 ist thermodynamisch günstig, da die freie Standardbildungsenergie ΔG^0 für CO_2 deutlich negativ ist und das CO_2 durch Ausgasen aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird. Die erhöhte intrazelluläre NADH-Konzentration, resultierend u. a. aus der Formiatoxidation, steigert die Reduktionskraft für die Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol, katalysiert durch MDH.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens wird neben den bereits genannten Kohlenstoffquellen als Substrat für die Herstellung D-Glucose eingesetzt. D-Glucose kann durch Umwandlung mit dem Enzym D-Glucose/Xylose-Isomerase (EC 5.3.1.5) zu D-Fructose umgewandelt werden (2). Die Umwandlung ist sowohl innerhalb als auch außerhalb des Organismus möglich. Der Einsatz von D-Glucose als Substrat in einem Verfahren zur Produktion von D-Mannitol bewirkt eine deutliche Verbesserung der Wirtschaftlichkeit des Verfahrens.

Für das beschriebene Verfahren eignen sich nicht nur Mikroorganismen, in die eine Formiat-Dehydrogenase und eine MDH eingebracht und/oder verstärkt wird, sondern auch Mikroorganismen, die bereits über eine Formiat-Dehydrogenase oder gegebenenfalls eine MDH verfügen, wie z. B.

5 Achromobacter parvolus, Methylobacterium organophilum, Mycobacterium formicum, Pseudomonas spec. 101, Pseudomonas oxalaticus, Moraxella sp., Agrobacterium sp., Paracoccus sp., Ancylobacter aquaticus. Dazu gehören Mikroorganismen wie z.B. Pseudomonas fluorescens, Rhodobacter sphaeroides, Rhodobacter capsulatus, Lactobacillus sp., Lactobacillus

10 brevis, Gluconobacter oxydans sowie bevorzugt auch Leuconostoc pseudomesenteroides oder Mikroorganismen, die bereits über beide Enzyme verfügen und jeweils in ihrer Aktivität verstärkt werden. Weiterhin geeignet sind beispielsweise auch methylotrophe Hefen wie Candida boidinii, Candida methylica oder auch Hansenula polymorpha, Pilze wie Aspergillus

15 nidulans und Neurospora crassa sowie alle auch in der Lebensmittelindustrie verwendeten Mikroorganismen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und dem Mikroorganismus ist es nunmehr möglich, eine verbesserte Umsetzung des Substrates in das

20 Produkt D-Mannitol zu erreichen. Es wird gegenüber bisher bekannten Verfahren eine erhöhte Produktivität, sowie eine erhöhte Ausbeute (bis zu 100 %) an D-Mannitol erreicht. Es wurden schon Konzentrationen bis zu 40 g/L erzielt. Das Verfahren ist daher für eine großtechnisch rentable Herstellung von D-Mannitol besonders geeignet. Durch die Schaffung des

25 Regenerationssystems mit Hilfe der Formiat-Dehydrogenase kann für die NADH verbrauchende MDH in erhöhtem Maße ohne eine nachteilige Bildung von stoffwechselbedingten Nebenprodukten mit ruhenden Zellen eine erhöhte Umsetzung des Substrates in das Produkt D-Mannitol ermöglicht werden.

Unter die Erfindung fallen auch die Verwendung von Nukleotidsequenzen gemäß Sequenzen Nr. 1, 2 und 3 codierend für GLF, MDH und FDH zur Verwendung in einem der oben beschriebenen Mikroorganismen.

5 Ebenso umfasst die Erfindung eine Genstruktur enthaltend mindestens eine oder mehrere der obigen Nukleotidsequenzen.

Ein Vektor enthaltend mindestens eine oder mehrere der obigen Nukleotidsequenzen oder eine oder mehrere der vorgenannten Genstrukturen ist ebenfalls in der Erfindung enthalten.

10 Die Erfindung umfasst auch die Verwendung der vorgenannten Nukleotidsequenzen, Genstrukturen und Vektoren in den beschriebenen Mikroorganismen bzw. Mikroorganismen, die diese Nukleotidsequenzen, Genstrukturen und Vektoren enthalten.

15 Die Zeichnungen zeigen beispielhaft Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens sowie eine schematische Darstellung der wichtigsten Stoffwechselwege, die für das Verfahren eine Rolle spielen. Es zeigt:

20 Fig. 1: Oxidoreduktionszyklus mit Formiat-Dehydrogenase und MDH schematisch in einer Zelle.

Fig. 2: Ableitung einer degenerierten 24 Basen-Oligonukleotid-Sonde von der N-terminalen Aminosäuresequenz der MDH Untereinheit von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291.

25 Fig. 3: Genkarte des 4,191 bp Eco RI Fragments isoliert aus der genomischen DNA-Plasmidbank von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 nach Immuno-Screening des *mdh*-Gens. Die Pfeile zeigen die Richtung der Translation des *mdh* ORF sowie 4 ORFs an.

Sequenz Nr. 1 zeigt die Nukleotidsequenz codierend für GLF aus *Zymomonas mobilis*.

Sequenz Nr. 2 zeigt die Nukleotidsequenz codierend für MDH aus *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

- 5 Sequenz Nr. 3 zeigt die Nukleotidsequenz codierend für FDH aus *Mycobacterium vaccae* N10.

Im Folgenden soll die Erfindung beispielhaft beschrieben werden.

10 I) **Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291: Reinigung und Charakterisierung des Enzyms; Klonierung und funktionelle Expression des *mdh*-Gens in *Escherichia coli***

a) Bakterienstämme und Plasmide

- 15 Als Quelle für die Isolierung der MDH wurde *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 eingesetzt. *E. coli* JM 109 (DE 3) (Promega) diente als Wirtsorganismus zur Herstellung einer partiellen Plasmidbank für die Isolierung der genomischen DNA aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291. Ein Teil der Plasmidbank wurde durch Ligation eines 4.0 –
20 4.5 kb *Eco* RI Fragments genomischer DNA aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 in pUC18 hergestellt.

b) Kultivierungsbedingungen

- 25 Zur Kultivierung von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 wurde folgendes Kultivierungsmedium verwendet:

Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 10 g/l, K_2HPO_4 10 g/l, D-Fructose 20 g/l, D-Glucose 10 g/l, Vitamin / Mineral-Lösung 10 ml/l, in destilliertem Wasser; pH-Wert auf 7,5 unter Verwendung von Ortho-Phosphorsäure.

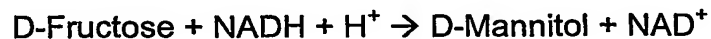
Zur Subklonierung und Präparation der Plasmidbank der genomischen *Leuconostoc* DNA, wurde *E. coli* JM109(DE 3) mit 170 Upm bei 37°C in Luria-Bertani Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) oder Carbenicillin (50 µg/ml) kultiviert.

5

c) Bestimmung der Aktivität von MDH aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291

Die Enzymaktivität wird in der vorliegenden Erfindung photometrisch über die Abnahme der NADH-Konzentration für die Reduktionsreaktion

10



bestimmt. Der Ansatz zur Messung der Aktivität der MDH enthielt 200 µM NADH und 200 mM D-Fructose in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer bei pH 6,5. Die spezifischen Aktivitäten der Rohextrakte und der partiell gereinigten Enzymisolate werden als Units pro Milligramm Protein (U/mg) angegeben, wobei 1 U als 1 µmol Substratabnahme pro Minute definiert wird.

15

d) Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Alle Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford durchgeführt.

20

e) Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

Reinheitsanalysen von Rohextrakten und partiell gereinigten Enzymisolaten, sowie Präparationen vorbereitend auf Western-Blots wurden elektrophoretisch in diskontinuierlichen 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt nach der Methode von Lämmli.

25

f) Isolierung der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291

Zur Isolierung der Mannitol-2-Dehydrogenase wurden nach einem Zellaufschluß folgende Verfahrensschritte durchgeführt: Ammoniumsulfat-Präzipitation, Hydrophobe Interaktionschromatographie, Anionentauscherchromatographie I, Anionentauscherchromatographie II, Größenausschlusschromatographie, sowie ein Chromato-focusing pH 5 – 4.

Die spezifische Aktivität der MDH betrug bei pH = 5,35 für die Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol 450 U/mg

10

g) Molekulargenetische Methoden

Die Isolierung von genomischer DNA aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291, die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelelen, die Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin modifiziertem dUTP und immunologische Detektion und DNA-DNA-Hybridisierung (Southern Blot) wurden durchgeführt.

15

Die aminoterminalen Aminosäuresequenzierung der 43 kDa-Enzymuntereinheit mittels Edman-Abbau und anschließender HPLC-Analyse ergab die oktamere Aminosäureabfolge MEALVLTG. Unter Verwendung einer Codon usage-Statistik für *Leuconostoc pseudomesenteroides*, wurde eine 2048fach degenerierte Oligonukleotid-Sonde zur Detektion des Mannitol-2-Dehydrogenase-Gens an genomischer DNA von *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291 abgeleitet (siehe Fig. 2). Die 24 bp-DNA-Sonde wurde mit einem Digoxigenin-11-dUTP-Schwanz am 3'-Ende versehen und diente zum Immuno-Screening von partiellen Plasmidbanken genomischer DNA von *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291. Auf diesem Wege wurde ein 4,2 kb-DNA-Fragment isoliert (Fig. 3). Mit geeigneten Primern wurde das *mdh*-Gen von diesem Fragment amplifiziert, in den Vektor pET24a(+) ligiert und in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und exprimiert. Zellextrakte von *E. coli* BL21(DE3)pET24a(+)Lmdh zeigten nach Induktion

20

25

30

in der SDS-Polyacrylelektrophorese eine starke Überexpressionsbande bei 43 kDa und eine spezifische Aktivität der Mannitol-2-Dehydrogenase von 70 U/mg Protein, während die Kontrollen (Zellen ohne Plasmid, Zellen mit leerem Plasmid) keine Aktivität zeigten.

5

Die Nukleotidsequenz des *mdh*-Gens aus *L. pseudomesenteroides* ATCC 12291 ist in Sequenz Nr. 2 gezeigt.

II) **Biotransformation von D-Fructose zu D-Mannitol mit einem rekombinanten *E. coli*-Stamm**

10

In einem rekombinanten *E. coli*-Stamm wurden die Enzyme Formiat-Dehydrogenase (EC 1.2.1.2) und Mannitol-2-Dehydrogenase (EC 1.1.1.67) überexprimiert, um in den Zellen einen Oxidations-Reduktionszyklus zu etablieren. In diesem Oxidations-Reduktionszyklus wird Wasserstoff von Formiat über zelluläres NAD⁺ auf D-Fructose übertragen, wobei D-Fructose zu D-Mannitol reduziert wird (s. Fig. 1). Zusätzlich wurde in den Zellen der Glukosefacilitator exprimiert, um die Verfügbarkeit des Substrats Fructose zu verbessern.

15
20

(a) Stämme und Vektoren

Es wurden die Stämme *E. coli* BL21 (DE3) Star (Invitrogen) verwendet. Als Vektoren wurden pET-24a(+)*fdh/mdh*, kodierend für den ORF der Formiat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae*, der Mannitol-2-Dehydrogenase aus *Leuconostoc pseudomesenteroides* und pZY507*glf* kodierend für den Glukosefacilitator aus *Zymomonas mobilis* verwendet.

25

Für die Biotransformation wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Star mit pET-24a(+)*fdh/mdh* und pZY507*glf* kotransformiert und auf LB-Agarplatten mit 25 µg/ml Chloramphenicol und 30 µg/ml Kanamycin selektiert. Als Kontrollen wurden *E. coli* BL21 (DE3) Star entweder mit pET-24a(+)*fdh/mdh* oder pZY507*glf* allein transformiert. Die Selektion der

30

Transformanten erfolgte auf LB-Agarplatten mit entweder 25 µg/ml Chloramphenicol (pZY507*glf*) oder mit 50 µg/ml Kanamycin (pET-24a(+)*fdh/mdh*). LB-Agarplatten für E. coli BL21 (DE 3) Star transformiert mit p pET-24a(+)*fdh/mdh* enthielten zusätzlich 1% (v/v) D-Glucose zur Verminderung der Basalexpression der Mannitol-2-Dehydrogenase und der Formiat-Dehydrogenas.

(b) Biotransformation

Nach der Überexpression von FDH, MDH und GLF in E. coli, werden nicht wachsende Zellen in einer Biotransformation eingesetzt. Je 1,0 g induzierte Zellen von E. coli BL21 (DE 3) Star pET-24a(+)*fdh/mdh* / pZY507*glf* wurden mit 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 gewaschen und in 50 ml Reaktionslösung mit 500 mM D-Fructose und 500 mM Natriumformiat in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,7 resuspendiert. Die Ansätze wurden in 100 ml-Kolben ohne Schikane bei 100 - 120 Upm und 30°C für 24 h geschüttelt. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 17 und 23 h nach Reaktionsstart wurden 1 - 2 ml-Proben des Überstandes genommen zur Messung der Konzentrationen von Formiat, D-Fructose und D-Mannitol. Die Proben wurden bei 5000g für 1 min zentrifugiert, der Überstand 0,2 µm-filtriert und bis zur Messung durch HPLC bei -20°C gelagert. Als Kontrolle wurden 1,0 g nicht induzierte Zellen von E. coli BL21 (DE 3) Star pET-24a(+)*fdh/mdh* / pZY507*glf* in gleicher Weise in der Biotransformation eingesetzt.

Die Konzentrationsbestimmungen von Formiat, D-Fructose und D-Mannitol im Reaktionsüberstand und im zellfreien Rohextrakt wurden mit einer HPLC-Anlage (Merck/Hitachi) durchgeführt.

Tabelle 1 zeigt beispielhaft Ergebnisse, die mit transformierten Mikroorganismen erreicht werden konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass die parallele Überexpression der Formiat-Dehydrogenase und der Mannitol-2-Dehydrogenase und des Glukosefacilitators in *E. coli* zu einer sehr hohen Produktion von D-Mannitol durch diese Zellen in einem Reaktionsmedium mit D-Fructose und Formiat führt.

- 5 Die bis zu 244 mM Mannitol nach 23 h stehen dem Verfahren ohne GLF mit nur 15 mM nach 17 h und dem Verfahren ohne FDH mit 20 mM nach 17 h gegenüber. Es konnte also eine ca. 12 - 15-fache Verbesserung erzielt werden.

10

Tabelle 1

rekombinante Gene	Bedingungen	Mannitol-Produktion [mM]	Fructose-Verbrauch [mM]	Formiat-Verbrauch [mM]
fdh / mdh / glf	+ IPTG / +Formiat / 23 h	244	332	471
fdh / mdh / glf	- IPTG / + Formiat / 17 h	0	n.d.	n.d.
fdh / mdh / glf	+ IPTG / -Formiat / 17 h	11	76	n.d.
mdh / glf	+ IPTG / + Formiat / 17 h	20	48	81
mdh / glf	- IPTG / + Formiat / 17 h	0	n.d.	n.d.
fdh / mdh	+ IPTG / + Formiat / 17 h	15	61	159
fdh / mdh	- IPTG / + Formiat / 17 h	0	n.d.	n.d.
mdh	+ IPTG / + Formiat / 17 h	0	57	35
mdh	- IPTG / + Formiat / 17 h	0	n.d.	n.d.
fdh / glf	+/- IPTG / + Formiat / 17 h	0	n.d.	n.d.
fdh	+/- IPTG / + Formiat / 17 h	0	n.d.	n.d.
glf	+/- IPTG / + Formiat / 17 h	0	n.d.	n.d.

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Verfahren zur Produktion von D-Mannitol unter Einsatz Mannitol-2-Dehydrogenase (MDH) exprimierender Organismen, bei welchen die Zucker-Substrate und/oder Zucker-Substratvorläufer der MDH über ein nicht-phosphorylierendes Zucker-Transportsystem in den Organismus transportiert werden.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die als Zucker-Transportsystem den Glukosefacilitator (GLF) aus einem Eukaryonten enthalten, eingesetzt werden
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die als Zucker-Transportsystem den Glukosefacilitator (GLF) aus *Zymomonas mobilis* enthalten, eingesetzt werden.
- 15 4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die die Sequenz Nr. 1 codierend für GLF enthalten, eingesetzt werden.
- 20 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Zucker Glukose und/oder Fructose eingesetzt werden.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die eine für eine MDH codierende Sequenz enthalten, eingesetzt werden
- 25 7. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die eine für MDH codierende Sequenz aus Mikroorganismen der Familie der Lactobacteriaceae, insbesondere *Leuconostoc pseudomesenteroides* enthalten, eingesetzt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die die Sequenz Nr. 2 codierend für MDH enthalten, eingesetzt werden.
- 5 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die eine für eine Formiat-Dehydrogenase (FDH) codierende Sequenz enthalten, eingesetzt werden.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die eine für FDH codierende Sequenz aus *Mycobacterium vaccae* enthalten, eingesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** Organismen, die die Sequenz Nr. 3 codierend für FDH enthalten, eingesetzt werden.
- 15 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Organismus ein Mikroorganismus eingesetzt wird.
- 20 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** Mikroorganismen der Gattung *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, den Enterobacteriaceae oder methylo-trophen Hefen und Pilzen eingesetzt werden.
- 25 14. Mikroorganismus, der die Enzyme MDH gemäß Sequenz Nr. 2 und FDH gemäß Sequenz Nr. 3 zur mikrobiellen Herstellung von D-Mannitol exprimiert und ein nicht-phosphorylierendes Zucker-Transportsystem aufweist, das die Zucker-Substrate und/oder Zucker-Substratvorläufer der MDH in den Mikroorganismus transportiert.

15. Mikroorganismus nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei dem Zucker-Transportsystem um den Glukosefacilitator (GLF) aus einem Eukaryonten handelt
- 5 16. Mikroorganismus nach Anspruch 14 oder 15, **dadurch gekennzeichnet, dass** es sich bei dem Zucker-Transportsystem um den Glukosefacilitator (GLF) aus *Zymomonas mobilis* handelt.
17. Mikroorganismus nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Organismus die Sequenz Nr. 1 codierend für GLF aufweist.
- 10 18. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 17, **dadurch gekennzeichnet, dass** er Glukose, Fructose oder Gemische hiervon zu D-Mannitol umsetzt.
- 15 19. Mikroorganismus nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 bis 18, **dadurch gekennzeichnet, dass** er eine für MDH codierende Sequenz aus Mikroorganismen der Familie der Lactobacteriaceae, insbesondere *Leuconostoc pseudomesenteroides* enthält.
- 20 20. Mikroorganismus nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 bis 19, **dadurch gekennzeichnet, dass** er eine für FDH codierende Sequenz aus *Mycobacterium vaccae* enthält.
21. Mikroorganismus nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 bis 20, **dadurch gekennzeichnet, dass** er aus der Gattung *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, den Enterobakteriaceae oder methylo-
trophen Hefen und Pilzen sowie aus allen auch in der Lebensmittel-
industrie verwendeten Mikroorganismen stammt.
- 25 22. Verwendung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 21 zur Herstellung von D-Mannitol.
23. Nukleotidsequenz gemäß Sequenz Nr. 1 codierend für GLF zur Verwendung in einem Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 21.

24. Nukleotidsequenz gemäß Sequenz Nr. 2 codierend für MDH zur Verwendung in einem Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 21.
- 5 25. Nukleotidsequenz gemäß Sequenz Nr. 3 codierend für FDH zur Verwendung in einem Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 21.
26. Genstruktur enthaltend mindestens eine oder mehrere Nukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 23 bis 25.
- 10 27. Vektor enthaltend mindestens eine oder mehrere Nukleotidsequenzen gemäß Ansprüchen 23 bis 25 oder eine oder mehrere Genstrukturen gemäß Anspruch 26.
28. Verwendung einer Nukleotidsequenz gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25 zur Transformierung eines Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 21.
- 15 29. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 21 enthaltend mindestens eine Genstruktur gemäß Anspruch 26.
30. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 21 enthaltend mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 27.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Verfahren sowie Organismus zur Herstellung von D-Mannitol

Die Erfindung betrifft ein Verfahren sowie Organismus zur Herstellung von D-Mannitol.

Durch Bereitstellung eines Verfahrens und eines Mikroorganismus zur Produktion von D-Mannitol mittels eines Mannitol-2-Dehydrogenase (MDH) und Formiat-Dehydrogenase (FDH, zur Cofaktor-Regenerierung) exprimierenden Organismus, wobei die Zucker-Substrate und/oder Zucker-Substratvorläufer der MDH über ein nicht-phosphorylierendes Zucker-Transportsystem in den Organismus transportiert werden, kann eine verbesserte D-Mannitol Produktion erreicht werden. Vorteilhafterweise handelt es sich bei dem Zucker-Transportsystem um den Glukosefacilitator (GLF) aus *Zymomonas mobilis*.

Fig. 1

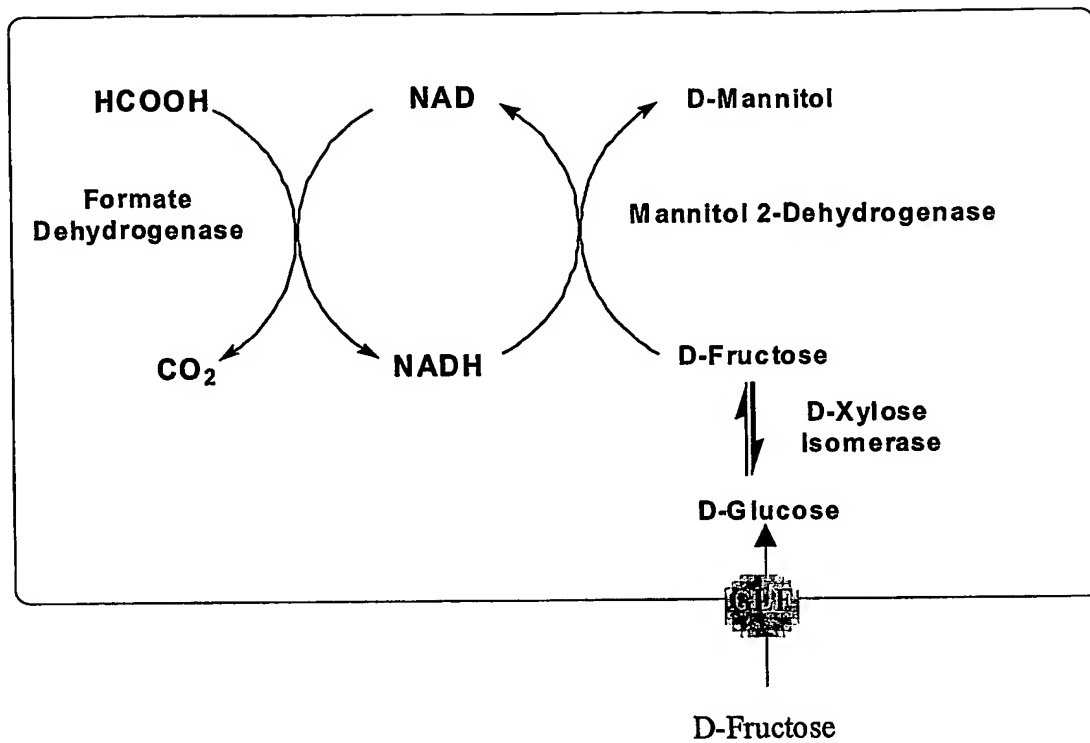


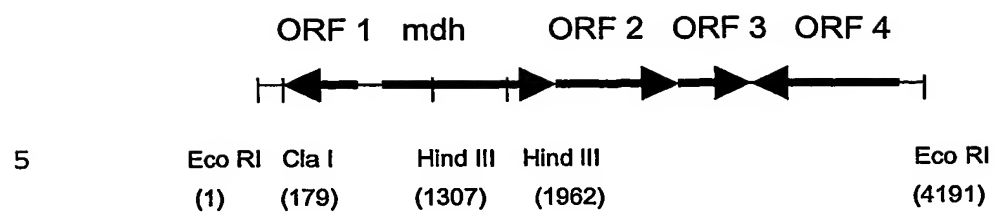
Fig. 2

5

Aminosäuresequenz		M	E	A	L	V	L	T	G	
10	Degenerierte Oligonucleotid- sequenz	{								
			ATG GAA GCU UUA GUU UUA ACA GGU							
				G	A	G	A	G	U	C
					C		C		G	A
					G		G		C	G

15

Fig. 3



SEQUENZ Nr. 1:

ATGAGTTCTGAAAGTAGTCAGGGTCTAGTCACGCGACTAGCCCTAATCGCTGCTA
TAGGCGGCTTGCTTTTCGGTTACGATTCAGCGGTTATCGCTGCAATCGGTACACC
5 GGTGATATCCATTTTATTGCCCTCGTCACCTGTCTGCTACGGCTGCGGCTTCC
CTTCTGGGATGGTCGTTGTTGCTGTTTTGGTCGGTTGTGTTACCGGTTCTTTGC
TGTCTGGCTGGATTGGTATTCGCTTCGGTCGTCGCGCGGATTGTTGATGAGTTC
CATTTGTTTCGTCGCGCGCCGGTTTTGGTGCTGCGTTAACCGAAAAATTATTTGGA
ACCGGTGGTTCGGCTTTACAAATTTTTTGCTTTTTTCGGTTTCTTGCCGGTTTAG
10 GTATCGGTGTGCTTTCAACCTTGACCCCAACCTATATTGCTGAAATTCGTCCGCC
AGACAAACGTGGTCAGATGGTTTCTGGTCAGCAGATGGCCATTGTGACGGGTGCT
TTAACCGGTTATATCTTTACCTGGTTACTGGCTCATTTTCGGTTCTATCGATTGGG
TTAATGCCAGTGGTTGGTGCTGGTCTCCGGCTTCAGAAGGCCTGATCGGTATTGC
CTTCTTATTGCTGCTGTTAACCGCACCGGATACGCCGCATTGGTTGGTGATGAAG
15 GGACGTCATTCCGAGGCTAGCAAAATCCTTGCTCGTCTGGAACCGCAAGCCGATC
CTAATCTGACGATTCAAAAGATTAAAGCTGGCTTTGATAAAGCCATGGACAAAAG
CAGCGCAGGTTTGTGTTTTGGTATCACCGTTGTTTTTGCCGGTGTATCCGTT
GCTGCCTTCCAGCAGTTAGTCGGTATTAACGCCGTGCTGTATTATGCACCGCAGA
TGTTCCAGAATTTAGGTTTTGGAGCTGATACGGCATTATTGCAGACCATCTCTAT
20 CGGTGTTGTGAAC TTCATCTTCACCATGATTGCTTCCCGTGTGTTGACCGCTTC
GGCCGTAAACCTCTGCTTATTTGGGGTGCTCTCGGTATGGCTGCAATGATGGCTG
TTTTAGGCTGCTGTTTTCTGGTTCAAAGTCGGTGGTGTGTTTTGCCTTTGGCTTCTGT
GCTTCTTTATATTGCAGTCTTTGGTATGTCATGGGGCCCTGTCTGCTGGGTTGTT
CTGTCAGAAATGTTCCCGAGTTCCATCAAGGGCGCAGCTATGCCTATCGCTGTTA
25 CCGGACAATGGTTAGCTAATATCTTGGTTAACTTCCTGTTTAAGGTTGCCGATGG
TTCTCCAGCATTGAATCAGACTTTCAACCACGGTTTCTCCTATCTCGTTTTTCGCA
GCATTAAGTATCTTAGGTGGCTTGATTGTTGCTCGCTTCGTGCCGGAACCAAAG
GTCGGAGCCTGGATGAAATCGAGGAGATGTGGCGCTCCAGAAGTAG

SEQUENZ Nr. 2:

TTAATATTCTATCACATGGTCTACTCCCCTTACTAAAATAAATGTGATAAACGTT
TGACTTTTATCTTGTTAAAGGTTTACCATTGTCCTCGTAAGTTAATTTAATCACAA
5 AGTAAAAAGGAGAACAAAC

ATGGAAGCACTTGTGTTAACTGGTACAAAAAATTAGAGGTTGAAAACATTGAAC
AACCTGAGGTAAAGCCGAATGAAGTGTGATTCATACAGCATTGCTGGTATTTG
CGGTACTGATCACGCTTTGTATGCCGGTCTTCCTGGCTCAGCCGATGCTGTGCCA
10 CCAATCGTTTTGGGGCATGAAAATTCTGGTGTTGTAGCTGAAATTGGTTCTGATG
TTACAAACGTTGCGGTGGGTGATCGTGTCAACAATTGATCCCAATATTTACTGTGG
TCAATGCAAGTATTGCCGTACAGCACGTCCAGAGCTTTGCGAAAACTTGTCTGCA
GTTGGTGTAACACGCAATGGTGGCTTTGAAGAATACTTTACTGCGCCCGCATCAG
TTGTTTACCAAATTCCAGATAATGTTTCACTTAAGTCAGCTGCCGTGGTTGAGCC
15 GATTTTCATGTGCTGTTACGGTATTCAACTTCTTAAAGTGACACCATAACCAAAG
GCATTAGTTATTGGTGACGGCTTCATGGGTGAACTCTTTGTTCAAATTCTGCAAG
CTTATGGCATTACCAAGTCGACTTGGCTGGTATTGTTCTGAAAAGCTTGCTAT
GAACAAAGAAAAGTTCGGCGTGAAAAATACGTACAATACAAAAGATGGCGACAAA
ATTCCCGAAGGCACTTACGATGTTGTTGTTGAAGCAGTTGGCCTACCACAGACAC
20 AAGAAGCCGCAATTGAAGCCTCAGCTCGTGGCGCTCAGGTTTTGATGTTTGGTGT
TGGCGGTCCCGACGCAAAGTTCCAAATGAACACTTACGAAGTCTTCCAAAAGCAA
TTGACGATTCAAGGATCATTTATCAATCCAAACGCATTTGAAGACTCATTTGGCAT
TGTTATCATCAGGCAAGTTAGACGTGGAATCGCTAATGTCACACGAATTAGATTA
CCAGACTGTTGATGACTTTGTGAATGGCAAGTTAGGTGTCGTTTCAAAGGCAGTC
25 GTTAAGGTTGGTGGCGAAGAGGCATAA

SEQUENZ Nr. 3:

atggcaaaggctcctgtgCGTTCTTTacgatgatccggtcgacggctacccgaaga
cctatgcccgcgacgatcttccgaa
5 gatcgaccactatccgggCGGCCagatcttgccgacgcccgaaggccatcgacttc
acgcccgggCagttgctcggtccgtctccggcgagctcggcctgcgcgaatatc
tcgaatccaacggccacaccctggtcgtgacctccgacaaggacggccccgactc
gggtgttcgagcgcgagctggtcgatgcggatgtcgtcatctcccagcccttctgg
ccggcctatctgacgcccgagcgcacatcgccaaggccaagaacctgaagctcgcgc
10 tcaccgcccggcatcgggtccgaccacgtcgatcttcagtcgggctatcgaccgcaa
cgtcaccgtggcgggaagtcacctactgcaactcgatcagcgtcgcgcgagcatgtg
gtgatgatgatcctg
tcgctgggtgcgcaactatctgcctcgcacgaatgggCGCGgaaggggcggtg-
gaacatcgccgactgcgtctccacgcctacgacctcgaggcgatgcatgtcgg-
15 caccgtggccgcccggccg-
catcgggtctcgcgggtgctgcgcctctggcgccggttcgacgtgcacctgcacta-
caccgaccgtcaccgcctgcccgaatcggtcgagaaggagctcaacct-
cacctggcacgcgacccgcgaggacatgtatccgggttgcgacgtgggtgacgct-
gaactgcccgtgcacccccgaaaccgagcacatgatcaatgacgagacgct-
20 gaagctgttcaagcgtggcgccctacatcgtaacaccgcccgcgg-
caagctgtgCGaccgcgatgccgtggcacgtgcgctc-
gaatccggccggctggccggctatgccggcgacgtgtggttcccg-
cagccggcgccgaaggaccacccctggcggaacgatgccctataacggcat-
gaccccgacatctccggcaccacgctgaccgcgcaggcgcggttatgCGgcggg-
25 caccgcgagatcctggagtgttcttcgagggccgtccgatccgcgacgaa-
tacctcatcgtgcagggcggcgctcttgccggcaccggcgcgcatctctactc-
gaagggcaatgccaccggcggttcggaagaggccgccaagttcaa-
gaaggcggtctga